

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФИЦ КазНЦ РАН



член. корр. РАН Калачев А.А.

29.08. 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный Исследовательский Центр «Казанский научный центр
Российской Академии Наук» о диссертационной работе
Ладейновой Марии Михайловны
«Анализ роли индуцированного локальным раздражением переменного
потенциала в системном изменении содержания фитогормонов»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
1.5.2 «Биофизика» (биологические науки)

Рост и развитие растений регулируются внутренними сигналами и внешними условиями окружающей среды. Растения подвергаются влиянию различных неблагоприятных факторов, действие которых может быть локальным или системным. Многие локальные стрессоры, такие как механическое повреждение, избыточное освещение, высокие и низкие температуры вызывают активацию защитных реакций не только в месте действия, но и на значительном удалении в нераздражённых частях растения.

Механизмы распространения и индукции дистанционных стрессовых сигналов растений в ответ на действие локального раздражителя на данный момент изучены недостаточно. Вопросы взаимодействия электрической и гормональной систем растений и индуцируемых ими системных ответов при локальном раздражении на данный момент остаются во многом не исследованными. В особенности большие пробелы находятся в области регуляции уровня стрессовых фитогормонов при распространении

вариабельного потенциала.

Получение новых знаний о механизмах регуляции содержания фитогормонов вариабельным потенциалом (ВП), механизме формирования системного ответа растения на действие стрессовых факторов, которые расширяют и дополняют теоретические представления в соответствующей области и могут быть использованы в перспективе в разработке рациональных стратегий ведения сельского хозяйства с использованием растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды. В связи с этим, представленная диссертационная работа, поможет улучшить понимание процессов адаптации растений к действию неблагоприятных факторов. Таким образом, тематика рассматриваемого исследования актуальна и имеет как теоретическое, так и практическое значение.

В работе описаны особенности формирования системного ответа растения на действие стрессовых факторов в растениях гороха и пшеницы. Несомненным преимуществом работы, подчёркивающим также её оригинальность, является охарактеризованная, пространственно-временная динамика электрической активности, содержания фитогормонов, а также активности фотосинтеза и транспирации. Диссертантом было обнаружено, что фотосинтетический ответ в растениях гороха и пшеницы при системном ответе на внешнее раздражение обладает двухфазностью. Предполагается, что индуктором первой быстрой фазы снижения активности фотосинтеза, по-видимому, являются изменения ионных концентраций при генерации вариабельного потенциала (ВП), вторая продолжительная фаза снижения фотосинтетической активности, вероятно, индуцируется изменением содержания фитогормонов. Среди проанализированных в настоящей работе гормонов (АБК, СК, ЖК и ЖК-иле) наиболее выраженные изменения были выявлены для жасмонатов, рост концентрации которых предшествует формированию продолжительной фазы ответа фотосинтеза.

Диссертантом было показано, что локальное раздражение индуцирует распространение ВП, которое сопровождается изменениями концентраций H^+ , Ca^{2+} , H_2O_2 . В настоящее время в литературе появляется всё больше доказательств участия внутриклеточного и внеклеточного рН в формировании системного ответа растений на различные стрессовые воздействия. В этой связи выявленное диссертантом снижение внутриклеточного рН, опосредованное ростом внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и увеличением концентрации H_2O_2 является вполне закономерным. Диссертант предполагает, что процессы изменения

концентраций ионов и H_2O_2 являются связанными: увеличение концентрации H_2O_2 активирует Ca^{2+} каналы, происходит приток Ca^{2+} в клетку, увеличение концентрации Ca^{2+} вызывает инактивацию H^+ -АТФазы, что и приводит к снижению внутриклеточного pH. В свою очередь изменение концентраций H^+ , Ca^{2+} , H_2O_2 может индуцировать изменение содержания жасмонатов. Автор приводит возможную схему процессов, в ходе которых может происходить увеличение биосинтеза жасмонатов. В частности предполагается, что в ходе увеличения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может повышаться каталитическая активность ферментов биосинтеза жасмонатов, 13-липоксигеназы LOX6 и фосфолипазы D (PLD), что приводит к повышенной продукции жасмонатов. Ca^{2+} также инактивирует H^+ -АТФазу, что вызывает закисление цитозоля. В ответ на снижение pH происходит усиление транслокации предшественника жасмонатов ОФДК из цитозоля в пероксисомы в результате перехода ОФДК в протонированную форму и как следствие свободного перемещения через мембрану пероксисомы, где щелочной pH обуславливает диссоциацию ОФДК и её накопление по принципу «анионной ловушки». Таким образом, большее количество субстрата в виде ОФДК становится доступным для пероксисомных ферментов, которые синтезируют ЖК. Увеличение концентрации жасмонатов в результате усиления биосинтеза приводит к ЖК-индуцированному закрытию устьиц, в результате чего происходит снижение доступности углекислого газа и развивается продолжительное снижение активности фотосинтеза.

Диссертационная работа Ладейновой М.М. оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ и построена по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», главы с результатами исследования и их обсуждением, заключением, выводами и списком литературы. Диссертация изложена на 115 страницах, содержит 28 рисунков, и список литературы, включающий 145 источников, 143 из которых на английском языке. Автореферат и опубликованные диссертантом работы отражают основные результаты. Автором опубликовано 12 работ, в том числе 4 статьи в изданиях, индексируемых в WOS/Scopus и входящих в список ВАК.

Во введении автор обосновывает актуальность проведения данного исследования, определяет его цель и задачи, формулирует научную новизну и приводит положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы автор дает подробную характеристику электрической и гормональной сигнальным системам растений, динамике содержания фитогормонов при действии локальных стимулов в

нераздражённых частях растений, влиянию электрических сигналов на изменение содержания фитогормонов и возможным механизмам индукции этих изменений, также рассматривается роль электрических сигналов и фитогормонов в развитии системного ответа.

В главе «Материалы и методы» перечислены использованные в работе объекты исследования, материалы и оборудование, описаны методики исследований. Приводится характеристика исследуемых объектов: растения гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и растения пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.), использованных в работе и условий их выращивания. Дано краткое описание широкого спектра использованных в работе методов как традиционных, так и достаточно новых, включая внутриклеточную регистрацию электрической активности с помощью микроэлектродной техники, методы жидкостной хроматомасс-спектрометрии ингибиторный анализ и методы флуоресцентного имиджинга. Так же авторами измерялась активность фотосинтеза путем регистрации динамики флуоресценции хлорофилла фотосистемы II. Для оценки пространственного распределения изменений транспирации авторы регистрировали изменения температуры поверхности листьев при помощи тепловизора. Анатомическую оценку растений проводили при помощи традиционных методов микроскопии.

В главе «Результаты и их обсуждение» автор приводит описание индуцированных локальным стимулом электрических сигналов, изменение содержания фитогормонов и активности фотосинтеза в различных отделах исследуемых растений. Проводится корреляционный анализ распространения ВП и увеличения содержания фитогормонов, что соответствует предположению о возможной роли электрических сигналов в качестве регулятора гормонального статуса растения при локальных повреждающих воздействиях. Так же автором проводится пространственно-временная динамика электрической активности, содержания фитогормонов и активности фотосинтеза при действии локального стимула. Затем для оценки участия электрических сигналов в индукции изменений содержания фитогормонов автор проводит анализ механизмов изменения содержания фитогормонов при действии локального стимула.

В Заключение Ладейнова М.М. подводит итог проведенному исследованию, который предваряет выводы диссертационной работы. Все полученные результаты обсуждены и подкреплены сопоставлением с ранее опубликованными данными других исследований. Достоверность полученных результатов основывается на применении классических электрофизиологических и микроскопических методов, а также

статистической достоверности полученных данных и корректности последующей интерпретации.

Диссертация Ладейновой М. М. производит общее положительное впечатление, однако, представленная рукопись вызывает ряд замечаний и вопросов:

- 1) обзор литературы достаточно скромный по объему и он мог бы быть расширен за счет выделения отдельных более специализированных глав. Тем более, что объём диссертационной работы невелик и позволяет это сделать. Количество ссылок в списке литературы также представляется довольно скромным;
- 2) употребление термина «Ca²⁺ сигнатура» кажется спорным, он не является общепринятым;
- 3) в разделе «Материалы и методы» было бы неплохо объяснить, по какой причине в работе было выбрано два объекта для исследования – растения гороха и растения пшеницы, и почему локальное раздражение в виде нагрева выполнялось только на растениях пшеницы, а ожог – на горохе? Возможно, что это связано с методическими сложностями проведения некоторых видов экспериментов на том или ином растении, что, скорее всего и отражается на результатах, где, например, ингибиторы и почти все флуоресцентные зонды применяли только на растениях пшеницы, а пространственно-временная динамика электрической активности, содержания фитогормонов и активности фотосинтеза только на растениях гороха;
- 4) в работе не хватает нативных фотографий, полученных в экспериментах по флуоресцентной микроскопии. В частности нет флуоресцентных фотографий экспериментальных объектов, загруженных флуоресцентными красителями (Fluo 4, BCECF и Ampliflu Red). Так же отсутствуют фото с тепловизора. Они бы, несомненно, украсили работу;
- 5) для загрузки листа растворами автор использует вакуум-инфильтрацию с последующей подачей давления 70 кПа. Хотя это распространенный прием, однако, надо учитывать, что при этом клетки испытывают гипоксию, а это быстрый и мощный стресс. Автору следовало бы упомянуть, что он знает об этом факторе. Кроме того, почему 70 кПа, а не 10 или 100 кПа?
- 6) понятно, что ожог удобный в исполнении вариант стресса, но при ожоге работают факторы температуры и терморазложения клеток и эти факторы по результату воздействия не просто разделить, но

следует упомянуть;

- 7) методическая глава изобилует названиями зарубежных производителей аппаратуры. При всём сложившемся в России уважении к зарубежной технике, не факт, что она всегда обеспечивает 100 % корректный результат. Бренд ничего не говорит читателю о конкретных ключевых параметрах прибора. Например, полезно было бы указать чувствительность измерительных усилителей при заданном отношении сигнал/шум. Кстати, отношение сигнал/шум зависит не только от усилителя, но и от качества экранировки измерительной зоны даже при использовании клетки Фарадея;
- 8) известны определённые проблемы в обеспечении нужной локализации кончика электрода внутри клетки. Целесообразно было бы более подробно остановиться на этом вопросе;
- 9) использование тепловизора для оценки транспирации изящный способ, но он скорее даёт карту распределения температур по листу, а это распределение связано, в том числе, с распределением устьиц по степени их открытости/закрытости и может дать информацию о механизме модуляции фотосинтеза. Не факт, что все устьица синхронно открываются/закрываются;
- 10) список литературы не сбалансирован по отечественным и зарубежным авторам, хотя это может быть обусловлено объективными причинами. Тем не менее, автор говорит только о двух отечественных работах из 145, при этом в списке упоминается ряд работ Воденеева с соавторами, Кудояровой и др.
- 11) в заключении диссертации дается вразумительная схема развития процессов в листьях при локальном стрессе. Заявленные цели в принципе достигнуты, хотя и представляются в довольно сжатой форме в виде трех выводов.

В целом, перечисленные выше замечания не влияют на сущность работы, а касаются скорее недостатков изложения.

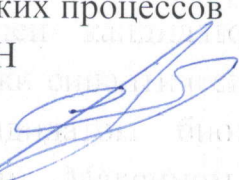
Подводя итог, можно заключить, что диссертация Ладейновой М. М. представляет собой самостоятельную научно-квалификационную работу, которая выполнена на высоком научно-теоретическом уровне. Экспериментальные данные и методические подходы данной диссертационной работы могут быть использованы в сельскохозяйственных, биологических и биотехнологических учреждениях, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по микробиологии в ВУЗах Российской Федерации.

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.2 — «Биофизика».

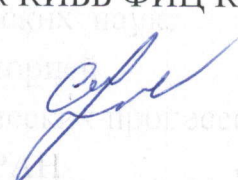
Работа отвечает требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в редакции от 11 сентября 2021 года), а ее автор Ладейнова Мария Михайловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.2 — «Биофизика» (биологические науки).

Отзыв подготовлен кандидатом биологических наук, заведующим лабораторией Биофизики синаптических процессов Самигуллиным Дмитрием Владимировичем, кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником Суловым Максимом Алексеевичем и главным научным сотрудником, доктором физико-математических наук Анисимовым Александром Васильевичем.

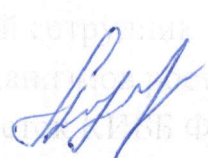
Кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией
Биофизики синаптических процессов
КИББ ФИЦ КазНЦ РАН


Самигуллин Дмитрий Владимирович

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории механизмов роста
растительных клеток КИББ ФИЦ КазНЦ РАН


Сулов Максим Алексеевич

доктор физико-математических наук,
г.н.с., лаборатории механизмов роста
растительных клеток КИББ ФИЦ КазНЦ РАН


Анисимов Александр Васильевич

Руководитель КИББ ФИЦ КазНЦ РАН,
доктор биологических наук, профессор


Чернов Владислав Моисеевич

29 августа 2022 г.


Подписи Самигуллиной М.А., Анисимова А.В.
Чернова В.М. заверены
и.о. главного секретаря, к.х.н.
 Знамenskaya С.А.

Организация: Федеральное государственное бюджетное бюджетного учреждения науки «Федеральный Исследовательский Центр «Казанский научный центр Российской Академии Наук»».

Сайт: <https://knc.ru/>

E.-mail: presidium@knc.ru

Телефон: +7(843) 292-75-97

Почтовый адрес: 420111, Республика Татарстан, Казань,
ул. Лобачевского, д.2/31